

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 avril 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/23867 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
G01N 21/17, C12Q 1/68

31/33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).
BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme,
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02703

(22) Date de dépôt international:
29 septembre 2000 (29.09.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/12229 30 septembre 1999 (30.09.1999) FR

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): CHA-
TON, Patrick [FR/FR]; "Loutre", F-38570 Theys (FR).
POUPINET, Ludovic [FR/FR]; 162, avenue Victor Hugo,
F-38170 Seyssinet (FR). GINOT, Frédéric [FR/FR]; 55,
rue du Général Leclerc, F-38340 Voreppe (FR). NOV-
ELLI ROUSSEAU, Armelle [FR/FR]; 29, rue du Parc,
F-38180 Seyssins (FR).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*): COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];

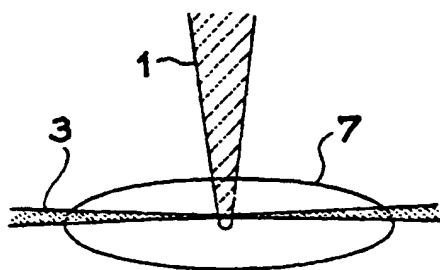
(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 03,
rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*national*): CA, JP, US.

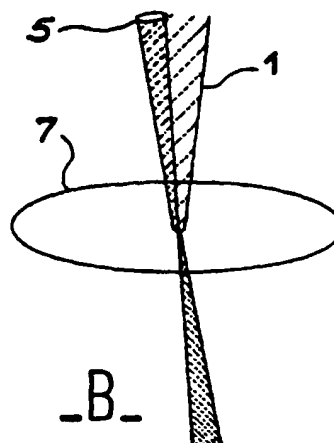
[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING A MOLECULAR RECOGNITION REACTION

(54) Titre: PROCEDE ET DISPOSITIF DE DETECTION D'UNE REACTION DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE



-A-



-B-

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting without marking a molecular recognition reaction, and a device for implementing said method. The invention concerns the general field of detection and analysis of a molecular recognition between a first molecule and a second molecule, for instance in molecular biology. The inventive method comprises the detection of molecular recognition using a photothermal method, for example a thermal lens microscope.

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte à un procédé de détection sans marquage d'une réaction de reconnaissance moléculaire, et à un dispositif pour la mise en oeuvre de ce procédé. Cette invention concerne le domaine général de la détection et de l'analyse d'une reconnaissance moléculaire entre une première et une deuxième molécules, par exemple en biologie moléculaire. Le procédé de la présente invention comprend la détection de la reconnaissance moléculaire par une méthode photothermique, e.g. par une méthode de lentille thermique.

WO 01/23867 A1



(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

**PROCEDE ET DISPOSITIF DE DETECTION
D'UNE REACTION DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE**

DESCRIPTION

5

Domaine technique de l'invention

La présente invention se rapporte à un procédé de
détection sans marquage d'une réaction de
reconnaissance moléculaire, et à un dispositif pour la
10 mise en oeuvre de ce procédé.

Cette invention concerne le domaine général de la
détection et de l'analyse d'une reconnaissance
moléculaire entre une première et une deuxième
molécules, par exemple en biologie moléculaire.

15 Selon l'invention, la reconnaissance moléculaire
peut être définie comme une interaction spécifique
entre deux molécules plus ou moins complexes,
conduisant à une liaison des deux molécules
suffisamment stable pour que les molécules puissent
20 être détectées liées. Il peut s'agir par exemple d'une
hybridation d'acides nucléiques (ADN et/ou ARN), d'une
réaction de reconnaissance de type antigène/anticorps,
d'une interaction de type protéine/protéine, d'une
interaction de type enzyme/substrat, etc... Les
25 molécules concernées par la présente invention sont
donc celles qui interviennent dans les interactions
précitées.

Le procédé de la présente invention permet de
détecter ce type de reconnaissance moléculaire, l'une
30 des deux ou les deux molécules étant fixées, sur un

support solide, en détectant une variation d'absorption par une méthode de photothermique.

Ce procédé trouve notamment une application dans la détection d'hybridation d'acides nucléiques sur support solide, en milieu aqueux ou à l'air, par exemple dans le cadre d'un criblage ("screening") ou d'une détection d'hybridation sur une biopuce.

Etat de la technique

Par exemple la détection de l'hybridation d'acides nucléiques est généralement réalisée au moyen d'un marquage à l'aide d'une molécule fluorescente. Mais ce type de détection nécessite l'utilisation de plusieurs réactifs chimiques, et entraîne un coût et un temps de traitement élevés. De plus, les techniques utilisant la fluorescence ne sont pas toujours très précises. Enfin, il y a modification d'au moins une molécule par le marquage, ce qui peut affecter la réaction de reconnaissance moléculaire.

Aussi, d'autres méthodes ont été proposées par exemple des méthodes optiques consistant à détecter des variations d'épaisseur ou d'indice dans un échantillon par exemple par ellipsométrie, photogoniométrie, ou par des méthodes de résonance.

Cependant, par exemple dans le cas des oligonucléotides sur support solide, les couches formées sont ultra-fines, de quelques angströms à quelques nanomètres d'épaisseur, de sorte que la détection des variations d'épaisseur ou d'indice nécessite des appareillages de laboratoire extrêmement sensibles et chers.

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de fournir une nouvelle technique de détection, sans marquage, d'une réaction de reconnaissance moléculaire
5 entre une première molécule, dite de capture, fixée sur un support solide et une deuxième molécule, dite cible, présente dans une solution à tester.

Le procédé de l'invention est caractérisé en ce que la détection est réalisée par une méthode
10 photothermique.

Selon l'invention, la réaction de reconnaissance ainsi que la première et la deuxième molécules peuvent être celles précitées.

Lorsque la première et la deuxième molécules sont
15 des molécules d'acides nucléiques, le procédé de l'invention peut par exemple comprendre les étapes suivantes :

- fixation de la première molécule d'acide nucléique sur un support solide,
- 20 - mise en contact de la première molécule d'acide nucléique fixée sur le support solide avec une solution à tester soupçonnée de comprendre la deuxième molécule d'acide nucléique, cette dernière étant apte à s'hybrider à ladite
25 première molécule, la mise en contact étant réalisée dans des conditions favorables à ladite hybridation,
- lavage du support solide pour isoler un échantillon de mesure constitué de ladite
30 première molécule fixée sur le support et

éventuellement de ladite deuxième molécule hybridée sur la première molécule, et

- mesure de l'absorption de l'échantillon par une méthode photothermique.

5

Le procédé de la présente invention peut comprendre en outre une étape de comparaison de la mesure de l'absorption de l'échantillon de mesure, précédemment défini avec celle d'un échantillon témoin
10 dit de calibration, dont l'absorption est une mesure connue.

La première molécule, fixée sur le support, peut aussi être appelée molécule de capture, et la deuxième molécule, présente dans la solution à tester, peut
15 aussi être appelée molécule cible. Lorsqu'il s'agit d'une molécule d'ADN fixée sur le support, elle peut aussi être appelée "sonde".

Il est important de noter que les couches minces d'acides nucléiques, hybridées ou non, sont
20 habituellement considérées comme étant non absorbantes. Ceci est notamment décrit dans "Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilized on a combinational assay", Gray et al., Langmuir 1997, 13, 2833-2842.

25 Malgré cela, les présents inventeurs se sont intéressés aux méthodes photothermiques appliquées à la détection et à l'analyse d'une réaction de reconnaissance moléculaire.

Ces méthodes ont toutes en commun l'excitation de
30 l'échantillon dont l'absorption doit être mesurée par une source lumineuse, appelée faisceau pompe, en

général un laser. Une partie de l'énergie lumineuse incidente est absorbée par l'échantillon. La proportion d'énergie absorbée est fixée par le spectre d'absorption de l'échantillon et le spectre d'émission
5 de la source d'excitation. Une partie de l'énergie absorbée est transformée en chaleur. Le reste peut être rayonné ou donner naissance à de la fluorescence ou à une réaction chimique par exemple. La chaleur induit une variation de température dans le milieu absorbant
10 et dans les milieux adjacents, cette variation de température peut également se traduire par une variation de densité et donc d'indice, ou par une variation de pression ou par l'apparition d'une onde acoustique. L'élévation de température due à
15 l'absorption est en général inhomogène et donne donc lieu à un gradient d'indice du milieu analysé et des milieux adjacents, la densité des milieux étant rendue inhomogène par l'élévation de température.

Les méthodes photothermiques consistent à mesurer
20 les effets induits par l'absorption.

Les inventeurs ont mis en évidence que parmi les méthodes photothermiques, la méthode de déflexion photothermique et la méthode de lentille thermique peuvent par exemple être utilisées selon la présente
25 invention.

La méthode de déflexion photothermique est une méthode qui consiste à mesurer la déviation d'un faisceau lumineux, appelé faisceau sonde, passant dans la zone où se trouve le gradient d'indice. En d'autres
30 termes, elle consiste à mesurer la déviation du faisceau sonde due à l'échauffement d'un échantillon

absorbant par l'intermédiaire du faisceau pompe. Cette technique de déflexion photothermique a été appliquée à l'analyse de surface telle que la cartographie d'absorption, l'imagerie de paramètre thermique, mais
5 jamais pour détecter une reconnaissance moléculaire telle que définie ci-dessus.

La méthode de lentille thermique consiste quant à elle à mesurer la variation de focalisation d'un faisceau lumineux passant dans la zone où se trouve le
10 gradient d'indice.

Une présentation complète des méthodes photothermiques peut être trouvée par exemple dans l'ouvrage "Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis, S.E. Bialkowski, vol. 134 in
15 Chemical Analysis : a Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications, Wiley".

Selon le procédé de l'invention, le support solide peut être défini comme étant un support sur lequel il est possible de fixer chimiquement directement ou
20 indirectement la première molécule. Le support a de préférence une absorption faible vis-à-vis de celle de l'échantillon placé à sa surface afin de ne pas gêner la détection photothermique. Par ailleurs, il a de préférence une conductivité thermique faible car une
25 conductivité trop importante du support induit une répartition large de la chaleur, donc une baisse du gradient de température et une baisse du signal détecté.

Selon l'invention, ce support peut être par
30 exemple un support qui sert dans la fabrication des puces à ADN, par exemple un support de silice, de verre

ou de plastique. Il est également possible de travailler avec des semi-conducteurs, en déposant sur leur surface des couches diélectriques pour améliorer le rapport signal à bruit.

5

Selon l'invention, la première molécule dite de capture est fixée sur le support. Cette fixation de la première molécule sur le support peut être réalisée par des réactions chimiques classiques, bien connues de l'homme du métier, et choisies en fonction du support, de la molécule à fixer, et des propriétés de résistance de la liaison que l'on désire pour l'application visée.

Cette fixation peut être directe ou indirecte.

Les documents 1 à 10 cités ci-dessous sont détaillés dans les références à la fin de cette description.

Par exemple, selon l'invention, lorsque le support est un support de silice, un traitement de fonctionnalisation du support de silice peut être réalisé, avant la fixation de la première molécule, de manière à modifier la surface du support pour y fixer des groupements chimiques réactifs qui permettront la fixation de la première molécule. Un tel traitement est décrit dans l'exemple 1 ci-dessous, mais on en trouvera de nombreux autres exemples dans la littérature spécialisée, comme Pease et al. (document 9), Guo et al. (document 4), Maskos et al. (document 6), etc. Comme il est dit précédemment, la silice n'est pas le seul support possible, et chaque support subira le traitement de surface qui lui convient. Pour illustrer

ceci sur un film de polypropylène par exemple, on se référera à Matson et al. (document 7).

Les groupements chimiques réactifs sont généralement des groupements amine tels que ceux cités dans Guo et al. (document 4), ou carboxylique tels que ceux cités dans Kohsaka et al. (document 5), ou époxy tels que ceux cités dans Maskos et al. (document 6), pour lesquels il existe des agents de couplage commerciaux efficace et facile d'utilisation (voir catalogue Pierce par exemple).

Le couplage covalent n'est pas la seule façon de fixer la première molécule sur son support. L'adsorption passive, largement utilisée pour fixer des anticorps sur des puits de réaction en polystyrène ou des microbilles tels que décrits dans Elaïssari et al. (document 3), est souvent très efficace voir aussi Balladur et al. (document 1). On peut aussi envisager des techniques de fixation plus récentes, comme la formation d'un film de Langmuir-Blodgett dans lequel est inclut des chaînes lipidiques sur lesquelles a été couplée chimiquement la première molécule voir Noy et al. (document 8) ; et Cornell et al. (document 2), ou encore la méthode métal-chélate voir Porath et al., 1975 (document 10).

25

Selon l'invention, lorsque la première molécule est fixée sur le support, les étapes suivantes peuvent être l'étape de mise en contact et l'étape de lavage précitées.

30 Selon l'invention, l'étape de mise en contact est bien entendu réalisée dans des conditions qui sont

favorables à ladite hybridation, c'est-à-dire, et de manière évidente pour l'homme du métier, à un pH, à une température et dans une solution adéquats pour permettre l'hybridation des acides nucléiques. Cette
5 solution constitue la solution à tester.

Selon l'invention, l'étape de lavage du support a notamment pour but d'éliminer les molécules en solution n'ayant pas réagi avec les molécules de reconnaissance sur le support, c'est-à-dire dans l'exemple ci-dessus
10 les molécules d'acides nucléiques de la solution qui ne se sont pas hybridées aux molécules d'acides nucléiques fixées sur le support. Ceci permet d'éviter un fort bruit de fond qui serait généré par lesdites molécules non liées au support et non hybridées lors de la
15 mesure.

Le lavage du support sur lequel sont fixées les molécules doit bien entendu être un lavage doux, qui ne dénature pas les acides nucléiques impliqués dans les hybridations, ne détruit pas lesdites hybridations
20 formées, et ne détache pas les premières molécules fixées sur le support. Un exemple de lavage est donné dans les exemples ci-dessous. Cette étape de lavage permet d'obtenir l'échantillon de mesure utilisé pour mesurer l'absorption par la méthode photothermique
25 choisie.

Selon le procédé de l'invention, lorsque la méthode photothermique choisie est une méthode de déflexion photothermique, on éclaire l'échantillon, comprenant par exemple des acides nucléiques, avec un
30 faisceau lumineux appelé faisceau pompe et l'absorption

du faisceau pompe par l'échantillon est détectée par la réfraction ou la réflexion d'un faisceau sonde.

Le faisceau pompe peut être par exemple un laser pulsé, ou un laser continu modulé en intensité. Il a de
5 préférence une longueur d'onde d'émission dans la bande d'absorption de l'échantillon, par exemple dans celle des acides nucléiques lorsqu'il s'agit de détecter une hybridation d'acides nucléiques.

Selon l'invention, le faisceau sonde a de
10 préférence une longueur d'onde qui n'est pas absorbée par le substrat ni par les molécules en présence.

Selon l'invention, le faisceau pompe peut être un faisceau d'un laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, ou un laser YAG quadruplé de longueur d'onde
15 266 nm. Le faisceau pompe peut également être fourni par une source polychromatique, par exemple une lampe à vapeur de mercure, si le spectre d'émission de la source et son intensité permettent d'obtenir suffisamment de signal pour la détection.

20 Le faisceau sonde est dirigé à proximité de la portion d'échantillon éclairée par le faisceau pompe. Par ailleurs, le faisceau sonde peut être identique ou différent du faisceau pompe. Le faisceau sonde est de préférence à faisceau laser, par exemple celui d'un
25 laser hélium à 633 nm.

La position relative des faisceaux sonde et pompe définit la configuration employée. Par exemple, le faisceau sonde peut traverser un ou plusieurs des milieux suivants : l'échantillon, par exemple les
30 oligonucléotides, le support solide, ou le milieu environnant, par exemple, un liquide ou de l'air.

L'orientation du faisceau sonde par rapport au faisceau pompe peut être choisie à loisir, par exemple en fonction de l'encombrement mécanique et/ou pour optimiser la sensibilité en cherchant le maximum
5 d'absorption en fonction de l'angle d'incidence.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent se croiser.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent être disposés dans une configuration transverse
10 ou dans une configuration sensiblement colinéaire. Dans la configuration transverse, les faisceaux sonde et pompe se croisent et sont perpendiculaires. Cette configuration est représentée schématiquement sur la figure 1a annexée. Dans la configuration sensiblement
15 colinéaire, les faisceaux pompe et sonde se croisent mais sont presque colinéaires. La figure 1b annexée est une représentation schématique de la configuration colinéaire.

Sur ces figures, la référence 1 indique le
20 faisceau pompe, la référence 3 le faisceau sonde dans la configuration transverse, la référence 5 le faisceau sonde dans la configuration sensiblement colinéaire et la référence 7 l'échantillon de mesure, positionné sur le support solide.

25 La réflexion ou la réfraction du faisceau sonde peut être détectée au moyen d'une photodiode multi-élément, par exemple d'un détecteur à deux ou quatre quadrants, d'une barrette ou d'une matrice, ou à l'aide d'une photodiode simple, soit partiellement recouverte
30 par un cache ou couteau, soit ne recevant qu'une partie du faisceau sonde.

Dans le cas d'une photodiode simple, un autre détecteur peut être nécessaire, afin de dissocier les variations d'absorption de l'échantillon des variations éventuelles de puissance du faisceau pompe.

5 La figure 2 est une illustration schématique de différentes configurations de détection de la déviation du faisceau sonde. Sur cette figure, -A- représente schématiquement un détecteur 9 bi-quadrant et un spot 11 formé par le faisceau sonde sur le détecteur, -B-
10 représente un détecteur quatre quadrants, -C- représente un détecteur matriciel, -D- représente une photodiode simple partiellement recouverte d'un cache 13, et -E- représente un photodétecteur désaxé.

Pour obtenir une sensibilité suffisante, la
15 déflexion du faisceau sonde induite par l'absorption d'une partie du faisceau pompe par l'échantillon, par exemple par les oligonucléotides, est de préférence distinguée des variations parasites dues à l'environnement, telles que les variations de
20 température du laboratoire. Pour cela, le faisceau pompe peut être marqué temporellement, soit par une modulation s'il est continu, soit par son fonctionnement impulsionnel. La maîtrise de la fréquence de modulation ou de la possibilité d'obtenir
25 un signal de référence permet de détecter préférentiellement la déflexion due à l'échauffement engendré par l'absorption partielle du faisceau pompe.

Quelle que soit la configuration des faisceaux utilisés, l'information obtenue est locale et concerne
30 une zone autour du point d'impact du faisceau pompe sur

l'échantillon, comprenant par exemple des acides nucléiques.

La taille de cette zone peut être fixée par les paramètres expérimentaux tels que la dimension du faisceau pompe au niveau du point d'impact sur l'échantillon ou sa fréquence de modulation, et par le comportement thermique du support, de l'échantillon et du milieu ambiant. Ceci est dû notamment à la diffusion de la chaleur dans ces différents milieux.

L'information étant locale, l'appareil de détection peut être couplé à un système de déplacement du support solide relativement au faisceau pompe. L'ensemble permet alors de comparer les valeurs de déviation du faisceau sonde d'un point à l'autre de l'échantillon, en particulier le signal peut être représenté sous forme de cartographie.

Par un point de l'échantillon, on peut par exemple comprendre une zone de reconnaissance moléculaire, c'est-à-dire une portion du support qui présente à sa surface des molécules présentant une propriété de reconnaissance d'un type donné de molécules cibles. Le support solide est donc associé à un échantillon, lui-même constitué de plusieurs points ou zones de reconnaissance. Les supports sont alors des supports fonctionnalisés.

Dans le cas des acides nucléiques, chacune de ces zones de reconnaissance est associée à une seule sorte de molécule de capture qui est préférentiellement, mais pas de manière limitative, différente des autres zones de reconnaissance qui constituent le même échantillon. Ainsi, il est possible soit d'augmenter la taille de

chaque zone de reconnaissance, soit d'avoir plusieurs zones de reconnaissance associées à la même sorte de molécule de capture, et ce dans le but d'augmenter le signal à détecter.

5 Lorsque le signal est représenté sous la forme de cartographie, on a alors la mesure de plusieurs zones de reconnaissance, qui correspondent à plusieurs molécules cibles hybridées ou non sur les molécules de capture.

10 De plus, une ou plusieurs de ces zones de reconnaissance peuvent être affectés à un ou plusieurs échantillons de calibration évoqués précédemment.

 Lorsque cela est nécessaire, le signal de déviation peut être converti en valeur d'absorption par
15 exemple par l'intermédiaire d'un échantillon de référence ou échantillon de calibration. Cet échantillon de référence, dont l'absorption est connue et stable, peut faire l'objet d'une mesure de déflexion photothermique dans les mêmes conditions expérimentales
20 que pour l'échantillon. La valeur obtenue permet par exemple de calculer un coefficient de conversion du signal électrique mesuré en niveau d'absorption.

 Enfin, lorsque la méthode photothermique est une méthode de lentille thermique, on utilise un faisceau
25 incident qui peut être un faisceau laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, ou un laser YAG quadruplé de longueur d'onde 266 nm.

 La méthode de lentille thermique est intéressante car le montage est plus simple.

30 En effet, dans ce cas, il n'y a qu'un seul laser qui fait office de laser sonde et de laser pompe. Après

interaction avec l'échantillon, le point de focalisation est modifié. La mesure consiste simplement à mesurer le changement du flux lumineux au point initial. Le faisceau pompe peut être utilisé soit en
5 transmission, c'est-à-dire à travers l'échantillon, soit en réflexion.

L'originalité de l'invention repose donc notamment sur le fait que jamais une technique photothermique n'a
10 été utilisée pour la détection d'une reconnaissance moléculaire par exemple d'une hybridation d'oligonucléotides sur un support solide. Plus généralement, aucune méthode basée sur la mesure de variation d'absorption n'a été utilisée pour ce type de
15 détection sur support.

Le procédé de la présente invention présente notamment l'avantage de ne nécessiter aucune étape de marquage ni marqueur. Il peut être utilisé par exemple
avantagusement pour un test diagnostique par une
20 détection d'hybridation d'acides nucléiques. Cette utilisation sera illustrée dans les exemples d'application ci-dessous.

De plus, il permet de détecter des absorptions et des variations d'absorption très faible, par exemple de
25 quelques dixièmes de parties par million.

La présente invention se rapporte également à un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, ledit dispositif comprenant les éléments
30 suivants :

- un moyen de positionnement du support solide,

- un moyen d'éclairage dudit support,
- un moyen de détection de l'absorption de la lumière par l'échantillon porté par le support, lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et
- un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection.

Selon l'invention, le moyen de positionnement du support peut être tout moyen connu de déplacement précis dudit support par exemple des platines de translation et de rotation micrométrique par exemple de la marque de commerce MicroContrôle. Ces moyens peuvent être motorisés afin de permettre une automatisation notamment pour une cartographie.

Selon l'invention, les moyens d'éclairage de l'échantillon et de détection de l'absorption de la lumière par l'échantillon peuvent être choisis notamment en fonction de la méthode photothermique utilisée, du support et de la reconnaissance moléculaire à détecter. Le moyen d'éclairage de l'échantillon peut être par exemple un faisceau pompe tel qu'il est défini précédemment.

Lorsqu'il s'agit d'une méthode de déflexion photothermique, le moyen de détection de l'absorption peut comprendre un faisceau sonde et des moyens de détection de la réfraction ou de la réflexion d'un faisceau sonde. Ces moyens sont décrits ci-dessous et dans les exemples suivants.

Lorsqu'il s'agit d'une méthode de lentille thermique, le moyen de détection peut comprendre un

faisceau sonde et un diaphragme placé au point de focalisation.

Selon l'invention, les moyens de positionnement des moyens d'éclairage et de détection précités peuvent
5 être des moyens tels que ceux précités pour le positionnement du support.

D'autres éléments de l'invention et avantages apparaîtront encore à la lecture de la description et
10 des exemples qui suivent en référence aux dessins en annexe, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Brève description de l'annexe et des figures

15 La liste des séquences illustrant l'exemple 4 est donnée dans l'annexe.

- la figure 1 est une illustration schématique des configurations transverse (figure 1a) et colinéaire (figure 1b) des faisceaux pompe et sonde dans une détection par déflexion
20 photothermique selon le procédé de l'invention ;
- la figure 2 est une illustration schématique de différentes configurations de détection de la
25 déviation du faisceau sonde ;
- la figure 3 est une illustration schématique d'une mesure de l'absorption d'un échantillon par la méthode de déflexion photothermique selon l'invention ;

- la figure 4 est un schéma illustrant un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention ;
- la figure 5 est un graphique illustrant des résultats de mesure de l'absorption d'un échantillon constitué d'acides nucléiques selon le procédé de la présente invention ;
- la figure 6 est une cartographie d'une détection selon le procédé de la présente invention réalisée sur un échantillon comportant deux rangées de plots d'oligonucléotides ;
- les figures 7a et 7b sont des histogrammes qui représentent le nombre de pixels de la cartographie de la figure 6.

Exemples

Exemple 1 : méthode de mesure

Le système utilisé selon l'invention est basé sur la déflexion photothermique en configuration transverse.

La figure 3 en annexe est une illustration schématique de principe d'une mesure de l'absorption d'un échantillon par la méthode de déflexion photothermique selon l'invention.

Sur cette figure, le faisceau pompe est issu d'un laser argon continu à 275 nm (COHERENT de type INOVA 40 (marque de commerce), il est focalisé sur l'échantillon 7 à l'aide d'un miroir sphérique (non représenté), le diamètre du spot (non représenté) est

d'environ 70 microns à la surface de l'échantillon 7. La longueur d'onde du faisceau pompe est choisie de manière à permettre la détection de l'hybridation d'acides nucléiques. La puissance du faisceau pompe est
5 de 300 mW en sortie du laser.

Le faisceau sonde 17 est celui d'un laser Hélium-Néon à 633 nm. La longueur d'onde de ce faisceau sonde est indifférente. Selon l'invention, une longueur d'onde éloignée de celle du faisceau pompe permet
10 d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.

La détection de la déflection est effectuée à l'aide d'un détecteur quatre quadrants -B- (voir figure 2) suivi d'une électronique d'amplification et de soustraction (non représentée). La référence 17a indique
15 le faisceau sonde dévié par déflection photothermique. L'angle θ indique l'angle d'incidence du faisceau pompe par rapport à la normale 20 à l'échantillon (indiquée en trait mixte).

Un filtre interférentiel (non représenté)
20 sélectionnant la longueur d'onde du faisceau sonde peut être placé devant le détecteur quatre quadrants afin d'éviter l'influence d'une lumière parasite provenant du faisceau pompe modulé.

Dans le dispositif de la présente invention, le
25 laser sonde, le détecteur quatre quadrants et l'électronique associée peut faire partie intégrante d'une cellule de mesure commerciale par exemple celle de la société ALIS. Le signal issu de cette cellule est envoyé vers une détection synchrone.

30 Le faisceau pompe peut être modulé grâce à un disque à fente mécanique, appelé aussi ci-après chopper

mécanique, dont la fréquence est réglable. Le signal de commande du chopper sert de référence à la détection synchrone. La fréquence est de 157 Hz. Le signal mesuré est obtenu à la sortie de la détection synchrone
5 (amplitude du signal de déviation à la fréquence de modulation du faisceau pompe).

Le positionnement de l'échantillon et des deux faisceaux les uns par rapport aux autres est assuré par des platines de translation et de rotation (marque de
10 commerce Micro-Contrôle, dont certaines sont motorisées afin de permettre une automatisation pour une cartographie, par exemple d'une biopuce, et dans certaines phases du réglage. Les réglages sont effectués automatiquement afin de maximiser le signal
15 de déflexion dans un plan orthogonal à l'échantillon contenant le faisceau sonde. Lors des cartographies, si cela est nécessaire, un déplacement correctif est effectué dans une direction orthogonale aux axes de balayage de la cartographie afin de garantir la
20 conservation d'un positionnement relatif correct au cours de la cartographie. Ce déplacement correctif est déterminé automatiquement dans une étape préliminaire de mesure. L'angle d'incidence du faisceau pompe par rapport à la normale à l'échantillon, et l'orientation
25 de la cellule par rapport à l'échantillon, peuvent être réglables. Les positions et orientations relatives des faisceaux sonde et pompe peuvent être également réglables indépendamment.

Un schéma d'un dispositif selon l'invention est
30 représenté sur la figure 4 annexée. Sur cette figure, un obturateur, non représenté sur le schéma, permet de

couper le faisceau pompe pendant les phases de déplacement et de le rétablir pendant un laps de temps bien déterminé après un temps d'attente choisi pour permettre la stabilisation du montage après un
5 déplacement. La référence 19 indique un laser argon à 275 nm, la référence 21 des miroirs de positionnement du faisceau laser, la référence 23 indique un chopper mécanique, la référence 25 le faisceau laser après son passage à travers le chopper, la référence 27 un miroir
10 de focalisation et la référence 31 l'échantillon de mesure.

La référence 34 constitue la cellule de mesure dans laquelle sont intégrés le laser sonde 32 et la diode à quatre quadrants 33.

15 La répétabilité du positionnement de l'échantillon peut être assurée par exemple par une lunette autocollimatrice qui n'est pas représentée sur le schéma. L'ensemble du dispositif de mesure peut être piloté par une station de travail, qui commande les
20 déplacements et fait l'acquisition des signaux de déviation dans deux directions orthogonales.

Dans ce mode de réalisation, la déviation est mesurée suivant une direction parallèle au plan de l'échantillon et suivant une direction orthogonale à
25 celui-ci. C'est cette dernière qui constitue le signal utile. Le signal électronique fourni par la détection synchrone peut être utilisé tel quel par comparaison d'un point à un autre de l'échantillon.

On peut également le convertir en valeur
30 d'absorption en effectuant une mesure de référence sur un échantillon réputé stable dans le temps et sous flux

laser, dont l'absorption est mesurable au spectrophotomètre et se situe dans la gamme de linéarité du banc de mesure de déflexion photothermique.

5

Exemple 2 : Préparation des supports fonctionnalisés :

Les molécules choisies dans cet exemple sont des acides nucléiques, en particulier des oligonucléotides.

La réalisation des couches minces biologiques pour
10 former l'échantillon de mesure selon le procédé de la présente invention peut par exemple comporter deux étapes :

- 1) fonctionnalisation du substrat, et
- 2) greffage des oligonucléotides.

15

Fonctionnalisation du substrat

Le support choisi est en silice. Les oligonucléotides ne pouvant pas établir de liaison covalente avec ce type de matériau, ce dernier est
20 fonctionnalisé. La fonctionnalisation du support a pour objet de modifier la surface du substrat afin d'y introduire des groupements réactifs qui permettront le greffage des oligonucléotides.

Cette étape requiert, par exemple, un premier
25 traitement du support par exemple par un mélange sulfochromique puis une silanisation. Le traitement par le mélange sulfochromique peut être réalisé au moyen d'une solution saturée d'oxyde de chrome dans de l'acide sulfurique à 95%. Il a pour objectif d'éliminer
30 les contaminants organiques présents sur le support et de générer des groupements silanols. La silanisation

est ensuite réalisée par les techniques classiques de silanisation, par exemple par incubation du support dans une solution de toluène, aminopropyldiméthylethoxysilane (AMPME) 1%. Durant
5 cette étape, les silanes réagissent avec les groupements silanols générés au cours du traitement par le mélange sulfochromique. Il en résulte la formation d'une couche de silane porteuse de groupements amine sur lesquels il est possible de greffer des
10 oligonucléotides.

Greffage des oligonucléotides

Les oligonucléotides, qui constituent les molécules de capture, sont greffés sur le support soit
15 directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'avidine.

Dans ce dernier cas, une molécule d'avidine est préalablement greffée sur le silane par l'intermédiaire d'un agent de couplage, le phénylène-diisothiocyanate
20 (PDC). L'avidine présente une forte affinité pour une petite molécule : la biotine. Elle peut donc reconnaître et fixer très fortement un oligonucléotide porteur d'une biotine. Le support est donc incubé dans une solution de diméthylformamide/pyridine 10% PDC
25 0,2%. Après lavage et séchage du support, l'avidine est déposée sous forme de gouttes de quelques millimètres de diamètre sur le support. Au même endroit est déposé l'oligonucléotide porteur d'une biotine.

Exemple 3 : Utilisation des supports fonctionnalisés

Cette étape consiste à effectuer l'hybridation d'acides nucléiques ou de fragments de ceux-ci, qui constituent les molécules cibles présente dans la solution à tester. Elle consiste essentiellement en deux étapes :

- 1) hybridation des acides nucléiques (dans l'expérience décrite, un oligonucléotide complémentaire), et
- 2) lavage des acides nucléiques non hybridés.

Bien entendu préalablement à ces étapes et dans le cas particulier des acides nucléiques, il peut y avoir nécessité à effectuer d'autres étapes préparatoires pour obtenir la solution à tester. Ces étapes peuvent être des étapes d'extraction, d'amplification et de clivage.

Extraction

Cette extraction est réalisée de manière tout à fait classique. En fait, on peut utiliser n'importe quelle technique d'extraction d'ADN, permettant d'obtenir du matériel susceptible d'être ultérieurement amplifié par un procédé d'amplification. Ces techniques de lyse des cellules, avec extraction puis purification des acides nucléiques sont habituellement celles recommandées pour des analyses génétiques, ou techniques rapides utilisant des produits commerciaux, tels que QIAmp Blood Kit (Marque déposée) de QIAGEN S.A.

Amplification

Ainsi, il peut être judicieux d'augmenter le nombre de molécules cibles en amplifiant le signal. De très nombreuses techniques d'amplification existent.

5 L'état de la technique décrit des méthodes permettant d'amplifier des séquences nucléotidiques utilisant des amorces spécifiques de ces séquences à amplifier. Ainsi on peut amplifier un fragment d'acide nucléique d'intérêt au sein d'une préparation d'acides
10 nucléiques. De nombreuses techniques utilisent des oligonucléotides complémentaires de la séquence cible servant d'amorces pour l'élongation par une polymérase.

Pour l'amplification des ADN, il existe la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les
15 brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184, ou la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069.

20 Pour l'amplification des ARN, plusieurs techniques ont aussi été décrites dans différents documents. Ces techniques sont les suivantes :

- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- 25 - NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,
- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5,194,370, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le
30 brevet US-A-5,399,491.

Clivage

Le clivage peut également être judicieux car le produit des amplifications peut être constitué d'acides nucléiques de grandes tailles. Ainsi, lorsque l'on hybride de tels acides nucléiques cibles sur des molécules de capture, les duplex formés après hybridation avec les acides nucléiques cibles sont peu stables. C'est également le cas lorsque les polynucléotides sont utilisés en tant que sondes de détection. Les raisons peuvent être dues à la gêne stérique ou au manque de spécificité entre la molécule de capture, qui a été synthétisé, et sa molécule cible qui n'est pas forcément de même taille. Il va donc y avoir une perte quantitative et qualitative du signal.

La gêne stérique peut être le fait, non seulement, de la longueur de l'acide nucléique, mais également de l'existence ou de la conservation de structures secondaires. Le clivage permet de détruire ces structures et ainsi d'optimiser l'hybridation. Cette gêne stérique joue un rôle particulièrement important dans le cas de l'hybridation sur des surfaces contenant des sondes de capture à forte densité, par exemple les puces à ADN mises au point par la société Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Shee et al., Science, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis", A. Caviani Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026). Dans cette technologie, les sondes de capture sont généralement de tailles réduites, autour de vingt nucléotides.

En ce qui concerne le clivage des acides nucléiques, de nombreuses méthodes sont décrites dans l'état de la technique. Premièrement, le clivage peut être enzymatique, c'est-à-dire que la fragmentation des acides nucléiques peut être réalisée par des nucléases (DNases ou RNases). On génère alors des fragments de petites tailles avec des extrémités 3'-OH, 5'-OH, 3'-phosphate, 5'-phosphate.

Deuxièmement, le clivage peut être chimique. Par exemple dans le cas des ADN, on peut effectuer la dépurination ou la dépyrimidination des ADN, qui sont alors clivés en présence d'une base par un mécanisme dit de « β -élimination ». Le clivage des ADN peut être réalisé par des mécanismes d'oxydation, d'alkylation, d'addition de radicaux libres entre autres. Pour cliver les ARN, on utilise des cations métalliques souvent associés à des molécules organiques utilisées comme catalyseurs chimiques, par exemple l'imidazole. Ce clivage est préférentiellement réalisé en milieu alcalin et génère des fragments avec des extrémités 3'-phosphate.

Hybridation

Le support sur lequel sont greifés les oligonucléotides est alors incubé dans une solution contenant l'oligonucléotide complémentaire par exemple une solution SSPE 6X + Triton X-100 à 0,05% + cible à 20 nM ; 30 min. à 35°C.

Lavage des acides nucléiques non hybridés

Après hybridation, les acides nucléiques n'ayant pas hybridés sont éliminés par lavages dans la même solution SSPE 6X + Triton X-100 0,05%.

5 Juste avant la détection selon le procédé de la présente invention, les échantillons sont sortis de leur solution de lavage, passés rapidement sous l'eau pour éliminer le tampon en prenant garde de ne pas "déshybrider" les acides nucléiques, et séchés à l'air.

10

Résultats

Une cartographie est réalisée sur un échantillon comportant deux rangées de plots d'oligonucléotides. Chaque plot fait environ trois millimètres de diamètre.

15 Les plots de la rangée inférieure comportent des oligonucléotides 32mères hybridés par leur complémentaire alors que ceux de la rangée supérieure comportent un autre oligonucléotide 32mères, non complémentaire. Le pas de cartographie est de
20 250 microns.

Le temps de mesure est de 5 secondes par point dont une seconde avant ouverture de l'obturateur. Le point de mesure est donc illuminé pendant 4 secondes. Les mesures sont effectuées aussi rapidement que
25 possible pendant cette durée. Le délai visé entre chaque mesure est d'un dixième de seconde. En chaque point de mesure, on dispose donc d'un signal dépendant du temps. L'allure de la variation du signal en fonction du temps est représentée par la courbe sur la
30 figure 5 annexée.

Sur cette figure, sur l'ordonnée, S représente le signal en unité d'absorbance, et sur l'abscisse, t représente le temps en secondes.

Le signal comporte une période de bruit de fond, avant ouverture de l'obturateur, suivie d'une montée rapide après l'ouverture. Lorsqu'un maximum est atteint, le signal mesuré redescend, traduisant en cela l'évolution de l'échantillon au point de mesure. Pour comparer les signaux obtenus en chaque point de la cartographie, il a été préférable d'extraire de chaque signal une valeur qui puisse être affichée sous forme de cartographie. Cette valeur peut être par exemple le maximum mesuré ou la valeur à un temps de mesure donné. Il est également possible d'ajuster une fonction bien choisie à chaque signal temporel et choisir comme valeur représentative l'un des paramètres d'ajustement de la fonction ou le maximum de celle-ci. Après cette phase de traitement, le résultat est affiché sous forme de cartographie.

La cartographie que nous avons obtenue expérimentalement est donnée sur la figure 6 en annexe. Il s'agit des maxima du signal mesuré en chaque point de la cartographie, maxima ayant lieu pour t proche de 1,5 seconde. Sur cette cartographie, les plots d'oligonucléotides, hybridés ou non, se distinguent parfaitement du fond dont l'absorption est beaucoup plus faible. Les plots de la colonne de droite, de couleur bleu clair sur la cartographie, ont une absorption plus faible que ceux de la colonne de gauche, de couleur verte à jaune sur la cartographie ; les rectangles noirs correspondent à des zones non

cartographiées, car il y a eu un décalage manuel du support pendant l'acquisition de la cartographie pour mieux voir les plots de la colonne de droite. L'observation de la cartographie suffit donc pour
5 déterminer si un plot d'oligonucléotide est hybridé ou non.

Les histogrammes des figures 7a et 7b en annexe représentent le nombre de pixels de la cartographie (axe des ordonnées) pour une intensité de signal donnée
10 (axe des abscisses), à deux échelles différentes pour les ordonnées. On voit clairement apparaître trois modes, correspondant à l'absorption du fond, des oligonucléotides non hybridés, et des oligonucléotides hybridés. Ces modes sont bien séparés ce qui permet
15 d'utiliser des méthodes de traitement d'image permettant de reconnaître automatiquement les plots hybridés ou non. Un simple seuillage permet par exemple de ne conserver que les plots hybridés et quelques points absorbants aisément distingués des plots de
20 mesure.

Exemple 4 : Test diagnostique

Une partie importante de la composante génétique de la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde a pu
25 être associée aux gènes HLA-DRB, codant pour la chaîne b des molécules HLA-DR impliquées dans la présentation des peptides aux lymphocytes T, fonction pivot au cœur des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Il a été montré plus précisément que la présence d'une
30 séquence particulière de cinq acides aminés, correspondant aux positions 70 à 74 de la troisième

région hypervariable des molécules HLA-DRB1, était retrouvée pour différents allèles rapportés comme étant associés à la polyarthrite rhumatoïde. L'implication de cet « épitope partagé » correspondant aux séquences

5 QKRAA ou QRRAA ou RRRAA (code à une lettre des acides aminés) est désormais bien documentée.

Toutefois, si ce groupe d'allèles DRB1*04 est effectivement associé à la polyarthrite rhumatoïde, tous les allèles actuellement connus (DRB1*0401 à

10 DRB1*0427) ne sont pas forcément associés à cette maladie. Il peut en résulter que si l'on se limite à un typage du groupe d'allèles DRB1*04, en fonction des allèles présents, on pourra obtenir, outre de vrais positifs ou de vrais négatifs, des faux positifs qui

15 vont alarmer inutilement le médecin et le patient.

Dans le cas d'une technique de biologie moléculaire (analyse des allèles DRB1 : résultats rendus selon la nomenclature DRB1*01 à DRB1*10), le clinicien s'intéresse essentiellement à la présence

20 d'allèle(s) DRB1*04.

En cas de résultats suggérant une prédisposition à la maladie, un deuxième test est généralement pratiqué, utilisant une technique de biologie moléculaire dite de haute résolution dite de sous-typage du DR4, pour

25 préciser l'allèle DRB1*04 (DRB1*0401 à 0427 selon la nomenclature officielle en 1998), seuls les allèles DRB1*0401, 0404, 0405 et 0408 étant rapportés comme étant associés à la maladie.

Extraction

L'extraction est effectuée par des produits commerciaux évoqués précédemment, tels que QIAmp Blood Kit (Marque déposée) de QIAGEN S.A.

5

Amplification

Cette amplification concerne le locus HLA-DR, incluant la région de l'exon 2 qui correspond aux codons 5 à 94 selon la nomenclature officielle, des gènes HLA-DRB. Le tableau 1 ci-dessous décrit les amorces utilisées lors de l'amplification par PCR de ce locus précédemment décrit. Il donne également l'ensemble des conditions physico-chimiques permettant la réalisation de cette amplification.

15

Amorces	P1 (amorce 5'-DR) : CCG GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG (5'>3') P2 (amorce 3'-DR) : TCG CCG CTG CAC TGT GAA G (5'>3')
Mélange réactionnel	tampon 10X TEMAG (*) : 10 µl dNTPs (20 mM) : 1 µl (0.2 mM final) P1 (30 µM) : 0.8 µl (0.25 µM final) P2 (30 µM) : 0.8 µl (0.25 µM final) AmpliTaq (5 U/µl) : 0.5 µl (2.5 U) ADN : 100-500 ng H ₂ O : QSP 100 µl
Programme d'amplification	(5 min à 96°C) + 10 x (10 sec à 98°C + 30 sec à 65°C + 30 sec à 72°C) + 30 x (20 sec à 96°C + 30 sec à 65°C + 30 sec à 72°C)

Tableau 1 : amplification simultanée de la région
d'intérêt HLA-DR

20 (*) : Tampon 10X TEMAG : 500 mM Tris-HCl pH 8.8 , 150
mM Sulfate Ammonium, 15 mM MgCl₂, 500 μM EDTA, 0.1 %
gélatine

Dans cet exemple, la distance séparant les deux amorces P1 et P2 est choisie pour être suffisamment courte pour ne pas avoir à effectuer de clivage. Bien entendu, si les amplicons réalisés le nécessitent, 5 cette fragmentation des acides nucléiques peut être effectuée selon les moyens et conditions exposés plus haut.

Préparation des supports fonctionnalisés

- 10 Pour pouvoir réaliser une étude de prédisposition génétique à la polyarthrite rhumatoïde, il y a lieu d'utiliser un ensemble de réactions d'hybridation mettant en œuvre un jeu de sondes oligonucléotidiques permettant l'analyse précise d'allèles ou de groupes 15 d'allèles HLA-DRB1 et HLA-B*27. Le tableau 2 décrit l'ensemble des sondes qui est utilisé pour la détection de ces deux maladies. Les indications qui sont données de la gauche vers la droite sont les suivantes :
- la référence de la sonde attribué dans la 20 nomenclature HLA,
 - le numéro de la séquence attribué dans ce document,
 - le gène HLA concerné,
 - la séquence constituant cette sonde, et
 - la localisation des codons (trois nucléotides) sur 25 les gènes HLA.

Sonde	SEQ ID NO	Gène HLA	Séquence (5'>3')	Localisation (codons)
C +	1	DR	TTC GAC AGC GAC GTG GGG	40-45
C -	2	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
4	3	DR	GAT ACT TCT ATC ACC A	29-34
QK71	4	DR	GAG CAG AAI CGG ICC <i>GAG CAG AAG CGG GCC</i>	69-73
IDE71	5	DR	CTG GAA GAC GAI CGG <i>CTG GAA GAC GAG CGG</i>	68-72
E74	6	DR	AGC AIA IGC IGG ICI AII <i>AGC AGA GGC GGG CCG AGG</i>	69-75
QR71	7	DR	CAG AGG CGI GII ICI GTG <i>CAG AGG CGG GCC GCG GTG</i>	70-75
S57	8	DR	GCC TAG CGC CGA GTA	55-60
1	11	DR	TGG CAG CTT AAG TTT GAA	9-14
52	12	DR	TAC TCT ACG TCT GAG T	10-15
2	13	DR	CAG CCT AAG AGG GAG TG	10-15
7+9	14	DR	IAG GTI GAC AIC GTG TGC <i>CAG GTG GAC ACC GTG TGC</i>	74-79
10	15	DR	GGA GGA GGT TAA GTT	8-13
8+12	16	DR	CTC TAC GGG IGA GT <i>CTC TAC GGG TGA GT</i>	10-15
3	19	DR	CCG GGT GGA CAA CIA C <i>CCG GGT GGA CAA CTA C</i>	73-78

Tableau 2 : Sondes oligonucléotidiques

- 5 Pour certaines sondes, une deuxième séquence en caractères italiques précise la séquence naturelle, c'est-à-dire uniquement constituée des quatre nucléotides adénosine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C). Les autres séquences reprennent les mêmes
- 10 nucléotides à l'exception de la substitution de certains par des nucléotides différents. Dans le cas présent, il s'agit de l'inosine. L'utilisation des inosines permet d'améliorer encore la spécificité des sondes vis-à-vis des séquences auxquelles elles vont

s'hybrider. La spécificité des sondes de captures est bien précisée dans le tableau 3 ci-après.

Sonde	SEQ ID NO	Spécificité
C +	1	Tous les DRB1*
C -	2	Aucun
4	3	DRB1*04
QK71	4	DRB1*0401, allèle possédant le motif QKRAA correspondant à l'épitope partagé
IDE71	5	DRB1*0402
E74	6	DRB1*0403, 0406 et 0407
QR71	7	DRB1*0101, 0404, 0405, 0408 et 1402, allèle possédant le motif QRRAA correspondant à l'épitope partagé
S57	8	DRB1*0405
1	9	DRB1*01
52	10	DRB1*03, 11, 13 et 14
2	11	DRB1*02
7+9	12	DRB1*07 et 09
10	13	DRB1*10
3	14	DRB1*03
8+12	15	DRB1*08 et 12

5

Tableau 3 : Spécificités principales des molécules ou sondes de capture

Ces sondes sont ensuite mises en place sur le support solide comme évoquées précédemment. Bien entendu pour faciliter l'analyse ultérieure, il convient de positionner chaque type de sonde sur un point ou une zone de reconnaissance.

10

Dans le cas présent. il y a nécessité d'avoir quinze zones de reconnaissance différentes, en incluant les contrôles, qu'ils soient positif ou négatif. Il est également possible d'effectuer d'autres tests sur un même support solide, il suffit pour cela d'augmenter le nombre de zones de reconnaissance.

Zones de reconnaissance		Zones de reconnaissance	
C +	SEQ ID NO 1	1	SEQ ID NO 9
C -	SEQ ID NO 2	52	SEQ ID NO 10
4	SEQ ID NO 3	2	SEQ ID NO 11
QK71	SEQ ID NO 4	7	SEQ ID NO 12
IDE71	SEQ ID NO 5	10	SEQ ID NO 13
E74	SEQ ID NO 6	8+12	SEQ ID NO 14
QR71	SEQ ID NO 7	3	SEQ ID NO 15
S57	SEQ ID NO 8		

Tableau 4 : Organisation des différentes zones de reconnaissance sur le support solide

10

Il y a un contrôle positif (SEQ ID NO 1), qui permet de détecter tous les allèles du gène DRB1*, ce qui permet de contrôler que l'amplification a bien concerné la région d'intérêt comprise entre les amorces P1 et P2 décrites dans le tableau 1. Le contrôle négatif (SEQ ID NO 2) n'a pas d'objectif diagnostic, il n'est présent que pour répondre à certaines normes. Cette séquence n'est absolument pas spécifique du HLA, et correspond à une séquence aléatoire non retrouvée chez les gènes HLA.

20

La SEQ ID NO 3 permet le typage de l'ensemble des allèles qui constitue le groupe DRB1*04. Elle permet

l'identification de tous les allèles DRB1*04, allèles appartenant au groupe défini par des techniques de typage HLA par sérologie, comme le groupe DR4. Il s'agit d'une sonde à faible résolution, c'est-à-dire
5 que de nombreux allèles peuvent être reconnus par celle-ci.

Les SEQ ID NO 4 à 8 permettent, quant à elles, le sous-typage de certains des allèles qui constituent le groupe DRB1*04, en précisant le ou les allèles
10 partageant une séquence particulière. Il s'agit de sondes à haute résolution, c'est-à-dire que quelques allèles, voire un seul, peuvent être reconnus par une de ces sondes.

Toutes ces sondes sont utilisées pour détecter les
15 allèles possédant l'épitope partagé associés à la prédisposition génétique à la polyarthrite rhumatoïde. Plus particulièrement, les sondes SEQ ID NO 4 et 7 permettent de détecter les allèles associés à la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde, et les
20 sondes SEQ ID NO 5 et 6 permettent de détecter les allèles associés à la résistance à ladite polyarthrite rhumatoïde. La sonde SEQ ID NO 8 permet de confirmer la présence d'un allèle DRB1*0405.

25

Résultats

Dans les résultats ci-après exposés, on a travaillé avec des solutions à tester dont on connaissait les caractéristiques, afin de pouvoir
30 contrôler si les résultats obtenus avec le procédé

d'analyse, selon la présente invention, sont bien conformes à la réalité.

1^{ère} SOLUTION A TESTER :

5 Le tableau 5 qui suit, met en évidence les valeurs de signal obtenues avec la première solution à tester, auxquelles on a soustrait la valeur du signal de la sonde SEQ ID NO 2 (tér in négatif). Ces valeurs plus ou moins éloignées de la valeur zéro, permettent de
10 déduire si l'hybridation a eu lieu ou non. La valeur 0 a été mise pour toutes les valeurs ne se distinguant pas significativement de la valeur obtenue pour SEQ ID NO 2 (écart inférieur à deux fois l'erreur standard à la moyenne calculée pour la sonde SEQ ID NO 2).

15

Sonde associée à la zone de reconnaissance	Signal (unité arbitraire)	+ / -	Sonde associée à la zone de reconnaissance	Signal (unité arbitraire)	+
SEQ ID NO 1	3000	+	SEQ ID NO 9	0	
SEQ ID NO 2	-	-	SEQ ID NO 10	0	
SEQ ID NO 3	920	+	SEQ ID NO 11	2100	
SEQ ID NO 4	260	+	SEQ ID NO 12	0	
SEQ ID NO 5	0	-	SEQ ID NO 13	0	
SEQ ID NO 6	0	-	SEQ ID NO 14	0	
SEQ ID NO 7	0	-	SEQ ID NO 15	0	
SEQ ID NO 8	0	-			

Tableau 5 : Résultats d'hybridation obtenus avec la première solution à tester

L'analyse du HLA-DR montre que :

- la sonde SEQ ID NO 1 est positive : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,

- 5 - les sondes SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 4 sont positives : un allèle DRB1*0401 est présent, et
 - la sonde SEQ ID NO 11 est positive : un allèle DRB1*02 est présent.

En conclusion, il y a présence d'un allèle de
 10 susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (DRB1*0401), le second allèle étant DRB1*02 qui fait preuve de neutralité vis-à-vis de la polyarthrite rhumatoïde.

Le typage HLA de ce premier échantillon était HLA-
 15 DRB1*0401 / 1602.

2ème SOLUTION A TESTER :

Le tableau 6 qui suit, met en évidence les valeurs de DO obtenues avec la deuxième solution à tester.

Sonde associée à la zone de reconnaissance	Signal (unité arbitraire)	+ / -	Sonde associée à la zone de reconnaissance	Signal (unité arbitraire)	+
SEQ ID NO 1	3000	+	SEQ ID NO 9	0	
SEQ ID NO 2	0	-	SEQ ID NO 10	0	
SEQ ID NO 3	310	+	SEQ ID NO 11	2700	
SEQ ID NO 4	0	-	SEQ ID NO 12	0	
SEQ ID NO 5	370	+	SEQ ID NO 13	0	
SEQ ID NO 6	0	-	SEQ ID NO 14	0	
SEQ ID NO 7	0	-	SEQ ID NO 15	0	
SEQ ID NO 8	0	-			

20 Tableau 6 : Résultats d'hybridation obtenus avec la deuxième solution à tester

Il y a quatre sondes positives, qui sont :

- la sonde SEQ ID NO 1 : l'amplification HLA-DR et le test d'hybridation ont bien fonctionné,
- 5 - la sonde SEQ ID NO 3 : il y a présence d'au moins un allèle DRB1*04,
- la sonde SEQ ID NO 5 : il y a présence d'un allèle DRB1*0402, et
- la sonde SEQ ID NO 11 : il y a présence d'un allèle
- 10 DRB1*02.

Il s'agit donc de deux allèles DR4, non impliqués dans la susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde DRB1*0402 et DRB1*02.

Le typage HLA de ce troisième échantillon était

15 HLA-DRB1*0402 / 02.

Références**Doc.1 :**

- 5 Balladur, V., Theretz, A., and Mandrand, B.
Determination of the Main Forces Driving DNA
Oligonucleotide Adsorption onto Aminated Silica
Wafers. *J.Colloid Interface Sci* 194(2):408-418,
1997.

Doc. 2 :

- 10 Cornell, B.A., Braach-Maksvytis, V.L.B., King,
L.G., Osman, P.D.J., Raguse, B., Wieczorek, L.,
and Pace, R.J. A biosensor that uses ion-channel
switches. *Nature* 387:580-583, 1997.

Doc. 3 :

- 15 Elaïssari, A., Cros, P., Pichot, C., Laurent, V.,
and Mandrand, B. Adsorption of oligonucleotides
onto negatively and positively charged latex
particles. *Colloids and Surfaces* 83:25-31, 1994.

Doc. 4 :

- 20 Guo, Z., Guilfoyle, A., Thiel, A.J., Wang, R.,
and Smith, L.M. Direct fluorescence analysis of
genetic polymorphisms by hybridization with
oligonucleotide arrays on glass supports.
Nucl.Acids Res. 22(24):5456-5465, 1994.

Doc. 5 :

- 25 Kohsaka, H., Taniguchi, A., Richman, D.D., and
Carson, D.A. Microtiter format gene
quantification by covalent capture of competitive

PCR products: application to HIV-1 detection.
Nucl.Acids Res. 21(15):3469-3472, 1993.

Doc. 6 :

- 5 Maskos, U. and Southern, E.M. Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. Nucl.Acids Res. 20(7):1679-1684, 1992.

Doc. 7 :

- 10 Matson, R.S., Rampal, J.B., and Coassin, P.J. Biopolymer synthesis on polypropylene supports-I. Oligonucleotides. Analytical Biochemistry 217:306-310, 1994.

Doc. 8 :

- 15 Noy, A., Vezenov, D.V., Kayyem, J.F., Meade, T.J., and Lieber, C.M. Stretching and breaking duplex DNA by chemical force microscopy. Chem.Biol. 4(7):519-527, 1997.

Doc. 9 :

- 20 Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., and Fodor, S.P. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91:5022-5026, 1994.

25 **Doc. 10 :**

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature 258(5536):598-599, 1975.

ANNEXE

Liste de séquences

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES :
- (i) DEPOSANT :
 - (A) NOM : BIOMERIEUX S.A.
 - (B) RUE : Chemin de l'Orme
 - (C) VILLE : Marcy-l'Etoile
 - 10 (E) PAYS : France
 - (F) CODE POSTAL : 69280
 - (G) TELEPHONE : (33) 78.87.20.00
 - (H) TELECOPIE : (33) 78.87.20.90
 - (ii) TITRE DE L'INVENTION : Procédé d'analyse de la prédisposition
 - 15 génétique d'un patient à au moins une maladie génétique
 - (iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 19
 - (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR :
 - (A) TYPE DE SUPPORT : Floppy disk
 - (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
 - 20 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
 - (D) LOGICIEL : PatentIn Release #1.0, version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 1 :
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - 25 (A) LONGUEUR : 18 nucléotides
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique
 - (iii) HYPOTHETIQUE : non
 - (ix) CARACTERISTIQUES :
 - 30 (D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR
 - (iv) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 1

TTCGACAGCG ACGTGGGG

10

5 (3) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 20 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

10 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE : amorce

(D) AUTRES INFORMATIONS :

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 2

15 TATGAAACTT ATGGGGATAC

10

20

(4) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 3 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

20 (A) LONGUEUR : 16 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

25 (A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 3

GATACTTCTA TCACCA

10

30

(5) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 4 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 15 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(B) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 4

GAGCAGAAIC GG ICC

10

(6) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 5 :

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 15 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20 (ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 5

CTGGAAGACG AICGG

25 10

(7) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 6 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 18 nucléotides

30 (B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE : amorce

(B) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 6

AGCAIAIGCI GGICIAII

10

10 (8) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 7 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 18 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

15 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 7

20 CACAGGCGIG IIICIGTG

10

(9) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 8 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

25 (A) LONGUEUR : 15 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

30 (A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 8
GCCTAGCGCC GAGTA

10

5 (12) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 9 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 18 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

10 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 11

15 TGGCAGCTTA AGTTTGAA

10

(13) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 10 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

20 (A) LONGUEUR : 16 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

25 (A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 12

TACTCTACGT CTGAGT

10

30

(14) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 11 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 17 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 13

CAGCCTAAGA GGGAGTG

10

(15) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 12 :

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 18 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

20 (ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 14

IAGGTIGACA ICGTGTGC

25 10

(16) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 13 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 15 nucléotides

30 (B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 15

GGAGGAGGTT AAGTT

10

10 (17) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 14 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 14 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

15 (iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

(A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 16

20 CTCTACGGGI GAGT

10

(18) INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 15 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

25 (A) LONGUEUR : 16 nucléotides

(B) TYPE : acide nucléique

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique

(iii) HYPOTHETIQUE : non

(ix) CARACTERISTIQUES :

30 (A) NOM/CLE :

(D) AUTRES INFORMATIONS : séquence issue du HLA DR

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 19
CCGGGTGGAC AACIAC

10

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection sans marquage d'une réaction de reconnaissance moléculaire entre une première molécule fixée sur un support, et une deuxième molécule présente dans une solution à tester, dans lequel la détection est réalisée par une méthode photothermique.
2. Procédé de détection sans marquage d'une réaction d'hybridation d'acides nucléiques entre une première et une deuxième molécules d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :
- fixation de la première molécule d'acide nucléique sur un support solide,
 - mise en contact de la première molécule d'acide nucléique fixée sur le support solide avec une solution à tester soupçonnée de comprendre la deuxième molécule d'acide nucléique, cette dernière étant apte à s'hybrider à ladite première molécule, la mise en contact étant réalisée dans des conditions favorables à ladite hybridation,
 - lavage du support solide pour isoler un échantillon de détection constitué de ladite première molécule fixée sur le support et éventuellement de ladite deuxième molécule liée à la première molécule, et
 - mesure de l'absorption de l'échantillon par une méthode photothermique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la méthode photothermique est une méthode de lentille thermique.

5 4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la méthode photothermique est une méthode de déflexion photo-thermique dans laquelle l'échantillon est éclairé par un faisceau pompe, et l'absorption du faisceau pompe par l'échantillon est détectée par la
10 réfraction ou la réflexion d'un faisceau sonde.

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel les faisceaux sonde et pompe se croisent.

15 6. Procédé selon la revendication 4, dans lequel les faisceaux sonde et pompe sont dans une configuration transverse ou dans une configuration sensiblement colinéaire.

20 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, dans lequel le faisceau pompe est choisi parmi un laser pulsé, un laser continu modulé en intensité, ou une lumière polychromatique.

25 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, dans lequel la réfraction ou la réflexion du faisceau sonde est détectée au moyen d'une photodiode multi-éléments ou à l'aide d'une photodiode simple ne recevant qu'une partie du faisceau sonde.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, dans lequel le faisceau pompe est un faisceau d'un laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, un laser YAG quadruplé de longueur d'onde 266 nm ou une lumière polychromatique.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, dans lequel le faisceau sonde a une longueur d'onde qui n'est pas absorbée par le substrat ni les molécules en présence.

11. Procédé selon la revendication 3, dans lequel un faisceau incident est utilisé, ledit faisceau étant un faisceau d'un laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, un laser YAG quadruplé de longueur d'onde 266 nm ou une lumière polychromatique.

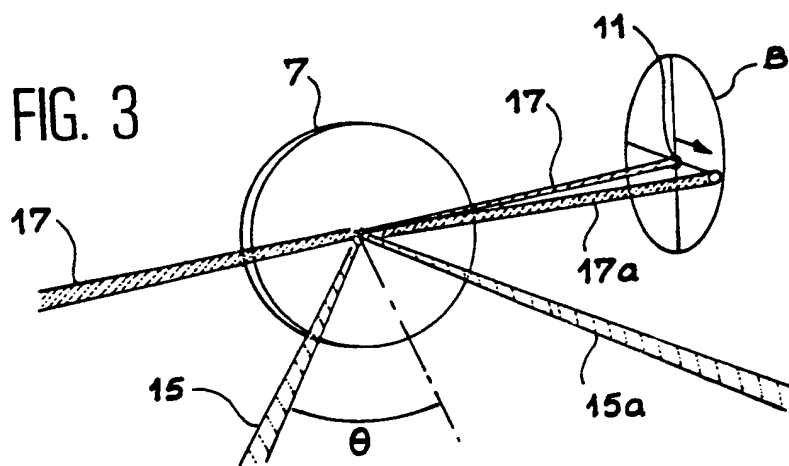
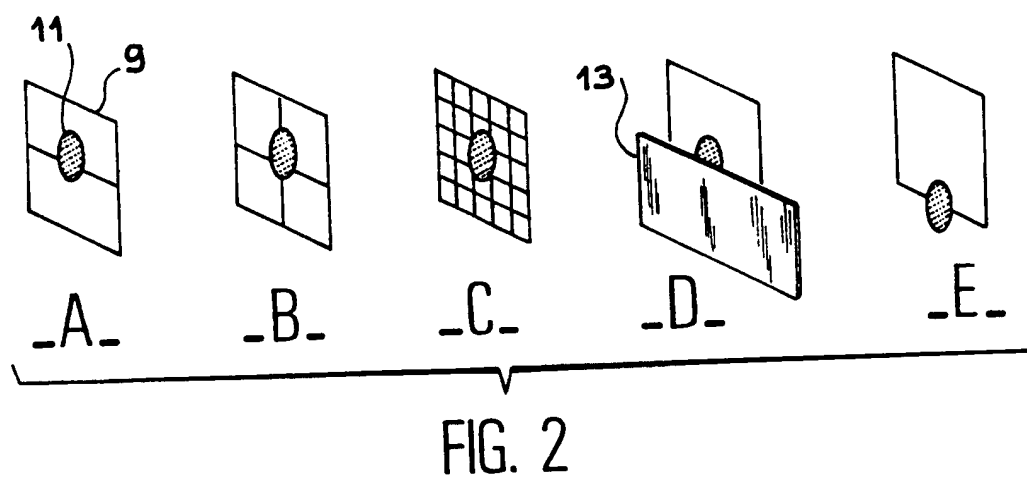
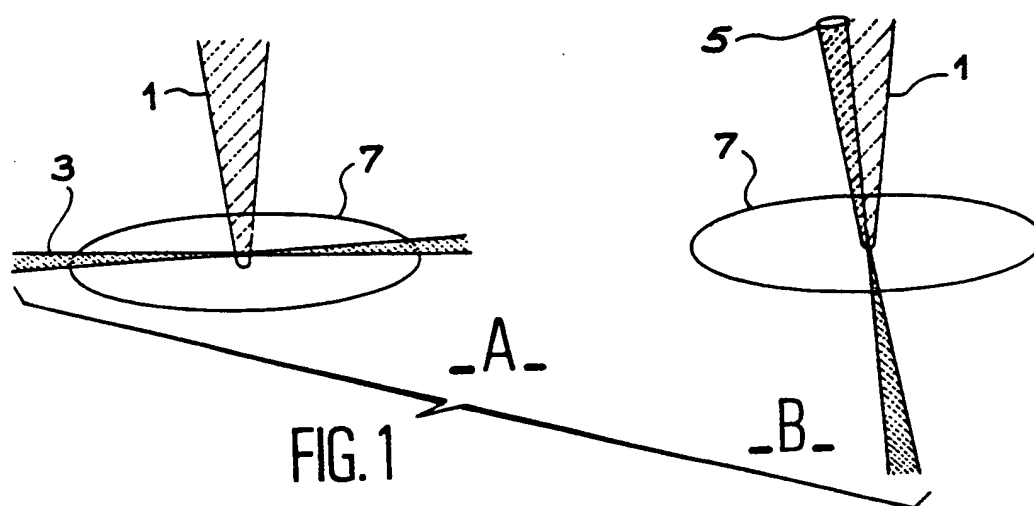
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre une étape de comparaison de la mesure de l'absorption de l'échantillon avec celle d'un échantillon témoin.

13. Utilisation de procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour un test, un diagnostic ou une détection d'hybridation d'acides nucléiques.

14. Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, ledit dispositif comprenant les éléments suivants :

- un moyen de positionnement du support,
- un moyen d'éclairage du support,

- un moyen de détection de l'absorption de la lumière par l'échantillon porté par le support lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et
- 5
- un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection.



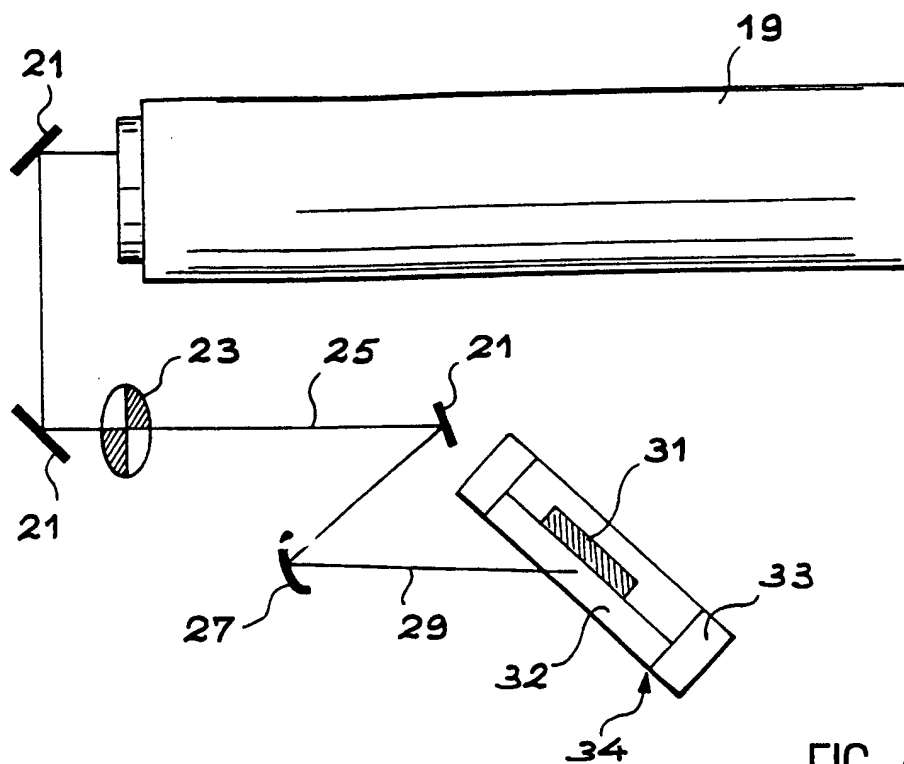


FIG. 4

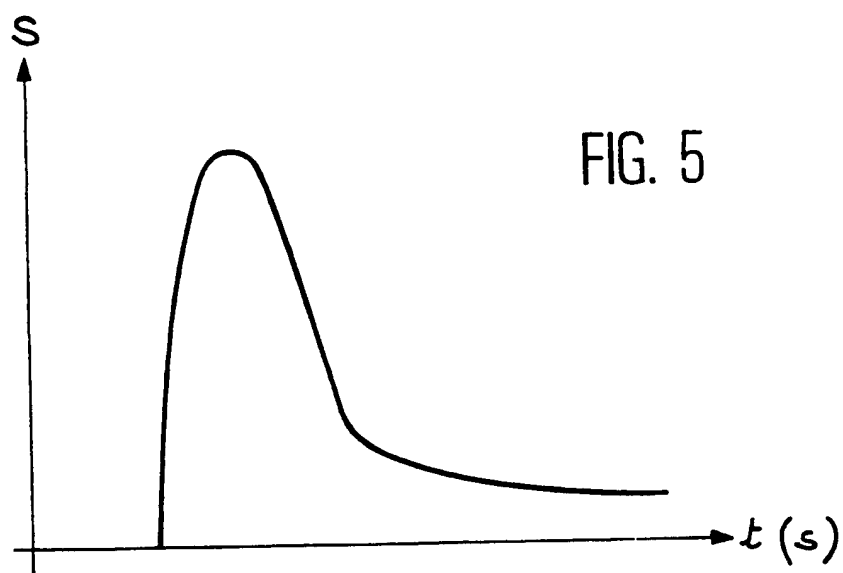


FIG. 5

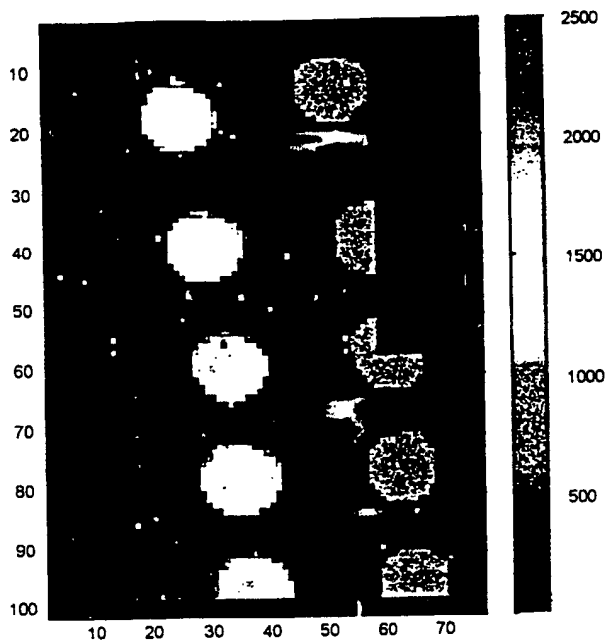


FIG. 6

FIG. 7 A

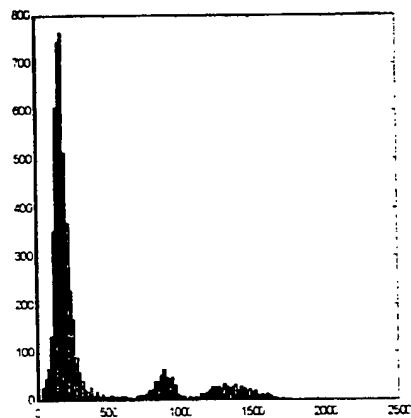
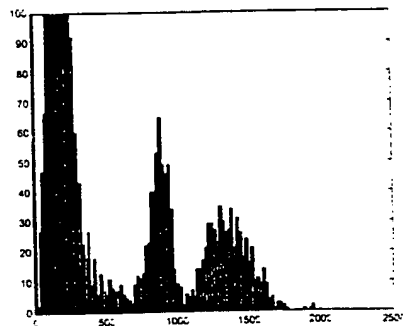


FIG. 7 B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies"</p> <p>BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207</p> <p>Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-9, 11, 13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2001

Date of mailing of the international search report

07/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application

PCT/FR 00/02703

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) column 1, line 8 - line 11 column 7, line 26 - line 47 column 9, line 11 - line 16 column 9, line 37 - line 46 -----	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	the whole document -----	1-4,6-9, 11
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 the whole document -----	1-3,14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. de internationale No
PCT/FR 00/02703

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N21/17 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies"</p> <p>BIO MEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207</p> <p>Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-9, 11, 13, 14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 janvier 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scheu, M

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23) colonne 1, ligne 8 - ligne 11 colonne 7, ligne 26 - ligne 47 colonne 9, ligne 11 - ligne 16 colonne 9, ligne 37 - ligne 46	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	le document en entier	1-4,6-9, 11
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 le document en entier	1-3,14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Det. de internationale No

PCT/FR 00/02703

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
<hr/>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 98/00515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: H05K 7/18, H05K 5/04, H02B 1/50
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: H05K, H02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4996628 A (R.T. HARVEY ET AL.), 26 February 1991 (26.02.91), figures 3,5, abstract --	1-10
A	EP 0049517 A2 (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT), 14 April 1982 (14.04.82), figures 1,2, abstract --	1-10
A	DE 2538340 B1 (SIEMENS AG), 9 December 1976 (09.12.76), figures 1,3 --	1-10
A	EP 0078405 A2 (BÜNDOPLAST GMBH & CO. KG), 11 May 1983 (11.05.83), figure 1, abstract --	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 1998

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Date of mailing of the international search report

17 -08- 1998

Authorized officer

Lars Jakobsson
Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

27/07/98

International application No.

PCT/SE 98/00515

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US	4996628	A	26/02/91	NONE	
EP	0049517	A2	14/04/82	SE 0049517 T3 DE 3038074 A,C	13/05/82
DE	2538340	B1	09/12/76	AT 364016 B AU 507334 B AU 1627676 A BE 845610 A CA 1058734 A CH 608679 A DK 141860 B,C DK 389776 A FI 59519 B,C FI 762240 A FR 2322509 A,B GB 1529250 A JP 1052272 C JP 52027303 A JP 55044479 B LU 75244 A NL 170486 B,C NL 7609552 A PT 65526 B SE 406689 B,C SE 7609183 A US 4213532 A ZA 7604432 A	25/09/81 14/02/80 02/02/78 16/12/76 17/07/79 15/01/79 30/06/80 01/03/77 30/04/81 01/03/77 25/03/77 18/10/78 30/06/81 01/03/77 12/11/80 18/02/77 01/06/82 02/03/77 22/02/78 19/02/79 01/03/77 22/07/80 27/07/77
EP	0078405	A2	11/05/83	DE 8132259 U DK 489082 A FI 823677 A	25/03/82 05/05/83 05/05/83
EP	0154570	A1	11/09/85	SE 0154570 T3 CA 1245334 A DE 3563294 A FR 2559336 A,B JP 60183797 A US 4630175 A	22/11/88 14/07/88 09/08/85 19/09/85 16/12/86

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/089164

Applicant's or agent's file reference B 13324.3 EE	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02703	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 30 September 1999 (30.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/17		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 March 2001 (17.03.01)	Date of completion of this report 07 February 2002 (07.02.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02703

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☐ the international application as originally filed

☒ the description: _____, as originally filed
pages _____ 1-50
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims: _____, as originally filed
pages _____ 1-8
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____ 9-13, filed with the letter of 04 December 2001 (04.12.2001)

☒ the drawings: _____, as originally filed
pages _____ 1/3-3/3
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description: _____, as originally filed
pages _____
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02703

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are referred to:

D1: ADELHELM K. ET AL.: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies", BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN, SEP. 14-15 1995, Vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA;

D2: US-A-5 874 213 (CUMMINS LENDELL L. ET AL.) 23 February 1999 (1999-02-23);

D3: ODAKE TAMAO ET AL.: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope", PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE, SEP. 9-SEP. 11 1998, Vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278, Proc SPIE Int Soc Opt

Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA.

2. Relevance of documents D1 and D2:

D1 and D2 disclose methods for detecting a molecular recognition reaction between a first molecule and a second molecule using a mirage effect. However, since nothing in these documents suggests that this detection should be carried out without using absorbing molecules which have a labelling function, and since the present description as a whole indicates that the expression "without labelling" excludes not only the use of fluorescence labels but also the use of absorbing labels, these documents are no longer considered to be relevant in relation to independent Claims 1 and 2 of the application.

3. Inventive Step of the subject matter of independent Claims 1 and 2 in relation to D3:

D3 (see abstract and drawings) discloses a two-stage method for detecting nucleic acids (DNA fragments). The first stage involves dividing a DNA sample into a plurality of DNA fragments by electrophoresis carried out on a gel supporting the said sample. The second stage involves detecting the said DNA fragments immobilised on the said gel using a photothermal method.

To a person skilled in the art, one of the important aspects of the teaching of this document is that it is possible to detect nucleic acid **without labelling** (D3

does not mention the use of labelling molecules) the said nucleic acids, regardless of the support, because it would be clear to a person skilled in the art that the detection step described in D3 could be applied to nucleic acids immobilised on a support other than the gel used in D3. To a person skilled in the art, it would be obvious to apply that teaching to the detection of a hybridisation reaction between a first and second nucleic acid molecule, one of these molecules being immobilised on a suitable support. He would thus arrive at the methods defined in Claims 1 and 2 of the application without having to exercise inventive skill.

Consequently, the present application does not satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

5. Dependent Claims:

- 5.1 Since all the features of Claims 3-8 are disclosed in D3 (see page 130 in particular), the subject matter of these claims is not considered to be inventive.
- 5.2 The features of Claims 9 and 11 are not inventive, because depending on the nucleic acids to be detected, a person skilled in the art would naturally be led to select a detection range and excitation laser as defined in these claims.
- 5.3 As mentioned above in paragraph 3, the application of the method of D3 to the detection of nucleic acid hybridisation would be obvious to a person skilled in the art. Consequently, the subject matter of Claim 13 involves no inventive step.

5.4 Although the features of Claims 10 and 12 are not mentioned in the available documents, the subject matter of these claims nevertheless appears to involve no inventive step, since it appears to be normal to select a probe beam wavelength which will not affect the measurement and to compare the measured absorption of the sample with that of a control sample, given that the measurement is a relative measurement.

PCT

REC'D 11 FEB 2002

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13324.3 EE	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02703	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 30/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N21/17		
Déposant COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 1 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 17/03/2001	Date d'achèvement du présent rapport 07.02.2002
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Rouault, P N° de téléphone +49 89 2399 2776 

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-50 version initiale

Revendications, N°:

1-8 version initiale

9-13 reçue(s) avec télécopie du 04/12/2001

Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02703

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n^{os} :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-13
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: ADELHELM K ET AL: 'Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies' BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY;BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng;Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA

D2: US-A-5 874 213 (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23)

D3: ODAKE TAMAO ET AL: 'High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope' PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION;STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng;Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA

2. Pertinence des documents D1 et D2:

Les documents D1 et D2 divulguent des procédés de détection par effet mirage d'une réaction de reconnaissance moléculaire entre une première molécule et une deuxième molécule. Cependant, comme rien dans ces documents ne suggère de réaliser cette détection sans utiliser de molécules absorbantes ayant une fonction de marquage, et comme il ressort de l'ensemble de la description de la demande que l'expression "sans marquage" exclut non seulement l'emploi de marqueurs fluorescents, mais aussi l'emploi de marqueurs absorbants, ces documents ne sont plus considérés comme étant pertinents vis-à-vis des revendications indépendantes 1 et 2 de la demande.

3. Activité inventive de l'objet des revendications indépendantes 1 et 2 vis-à-vis du document D3:

Le document D3 (voir l'abrégé et les figures) révèle un procédé de détection d'acides nucléiques (fragments d'ADN) en deux étapes. La première étape consiste à séparer un échantillon d'ADN en une pluralité de fragments d'ADN par électrophorèse effectuée sur un gel supportant ledit échantillon. La deuxième étape concerne la détection desdits fragments d'ADN fixés sur ledit gel à l'aide d'une méthode photothermique.

Pour l'homme du métier, un des enseignements importants de ce document est que la détection d'acides nucléiques est possible **sans marquage** (le document D3 ne mentionne pas l'emploi de molécules de marquage) desdits acides nucléiques, et cela indépendamment du support, car il serait clair pour cet homme du métier que l'étape de détection décrite dans D3 pourrait être appliquée à des acides nucléiques fixés sur un autre support que le gel utilisé dans D3. Une application évidente pour l'homme du métier de cet enseignement serait la détection d'une réaction d'hybridation entre une première et une deuxième molécule d'acides nucléiques, l'une de ces molécules étant fixées sur un support adéquat. Il arriverait ainsi, sans avoir besoin de faire preuve d'activité inventive, aux procédés définis dans les revendications 1 et 2 de la demande.

Par conséquent, cette demande ne satisfait pas aux exigences de l'article 33 (3) PCT.

5. Revendications dépendantes:

- 5.1 Comme les revendications 3-8 contiennent des caractéristiques qui sont toutes divulguées dans le document D3 (voir en particulier la page 130), leur objet n'est pas considéré comme inventif.
- 5.2 Les caractéristiques des revendications 9 et 11 ne sont pas inventives, car selon les acides nucléiques à détecter, l'homme du métier serait naturellement amené à choisir un domaine de détection et un laser d'excitation tels que définis dans ces

revendications.

- 5.3 Il a été indiqué au point 3 ci-dessus que l'application du procédé de D3 à la détection d'hybridation d'acides nucléiques serait évidente pour l'homme du métier. Par conséquent, l'objet de la revendication 13 n'implique pas d'activité inventive.
- 5.4 Bien que les caractéristiques des revendications 10 et 12 ne soient pas mentionnées dans les documents disponibles, l'objet de ces revendications ne semble pas néanmoins impliquer d'activité inventive, car il paraît normal de choisir une longueur d'onde pour le faisceau sonde qui n'influence pas la mesure et de comparer la mesure de l'absorption de l'échantillon avec celle d'un échantillon témoin, comme la mesure est une mesure relative.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, dans lequel le faisceau pompe est un faisceau d'un laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, un laser YAG quadruplé de longueur d'onde 266 nm ou une lumière polychromatique.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, dans lequel le faisceau sonde a une longueur d'onde qui n'est pas absorbée par le substrat ni les molécules en présence.

11. Procédé selon la revendication 3, dans lequel un faisceau incident est utilisé, ledit faisceau étant un faisceau d'un laser choisi parmi un laser argon continu à 275 nm, un laser YAG quadruplé de longueur d'onde 266 nm ou une lumière polychromatique.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre une étape de comparaison de la mesure de l'absorption de l'échantillon avec celle d'un échantillon témoin.

13. Utilisation de procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour un test, un diagnostic ou une détection d'hybridation d'acides nucléiques.

~~14. Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, ledit dispositif comprenant les éléments suivants :~~

~~- un moyen de positionnement du support,~~

~~- un moyen d'éclairage du support.~~

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 juillet 2001 (04.07.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02703	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13324.3 EE
Date du dépôt international (jour/mois/année) 29 septembre 2000 (29.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)
Déposant CHATON, Patrick etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

17 mars 2001 (17.03.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé S. Mafla (Fax 338.87.40) no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	--

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DES TERMES, Monique
Brevatome
03, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 novembre 2000 (06.11.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13324.3 EE	
Demande internationale no PCT/FR00/02703	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29 septembre 2000 (29.09.00)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
30 sept 1999 (30.09.99)	99/12229	FR	24 octo 2000 (24.10.00)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Philippe Bécamel no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies"</p> <p>BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207</p> <p>Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-9, 11, 13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2001

Date of mailing of the international search report

07/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) column 1, line 8 - line 11 column 7, line 26 - line 47 column 9, line 11 - line 16 column 9, line 37 - line 46	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	the whole document	1-4,6-9, 11
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 the whole document	1-3,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13324.3 EE	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02703	Date du dépôt international(jour/mois/année) 29/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 30/09/1999
Déposant COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☒ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1

☐ Aucune des figures n'est à publier.

Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 de la première feuille)

L'abrégé doit être modifié de la façon suivante :

ligne 11 : après "photothermique" ajouter ", e.g. par une méthode de
lentille thermique"

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N21/17 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>✓ ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies"</p> <p>BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207</p> <p>Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-9, 11, 13, 14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 janvier 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scheu, M

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X ✓	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23) colonne 1, ligne 8 - ligne 11 colonne 7, ligne 26 - ligne 47 colonne 9, ligne 11 - ligne 16 colonne 9, ligne 37 - ligne 46 ----	1,2
X ✓	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA le document en entier	14
A	le document en entier	1-4,6-9, 11
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 le document en entier -----	1-3,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A AU 3368695 A WO 9606189 A	04-04-2000 14-03-1996 29-02-1996
<hr/>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/FR 00/02703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N21/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies"</p> <p>BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207</p> <p>Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-9, 11, 13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2001

Date of mailing of the international search report

07/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02703

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference TETR 7456/00	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP 00/ 10679	International filing date (day/month/year) 26/10/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/10/1999
Applicant N.V. BELGACOM MOBILE S.A.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☒ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1
☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/10679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 H04Q1/02 H04Q1/10 H05K5/00 H05K7/18 H02B1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 H04Q H05K H02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, IBM-TDB, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 47339 A (ERICSSON TELEFON AB L M ; LOEOEW PER ROLAND (SE); NYGREN LARS (SE);) 22 October 1998 (1998-10-22) abstract page 11, line 15 -page 15, line 2; figure 2	1-6,8
X	US 5 398 159 A (ANDERSSON NILS A T ET AL) 14 March 1995 (1995-03-14) abstract; figure 2A column 1, line 5 -column 2, line 60 column 7, line 15 - line 30 column 10, line 37 - line 69	1,6,8



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

07/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willem, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9847339 A	22-10-1998	SE 509495 C AU 7088298 A SE 9701420 A	01-02-1999 11-11-1998 17-10-1998
US 5398159 A	14-03-1995	AU 669043 B AU 5723194 A BR 9305896 A CA 2130194 A CN 1090460 A,B GB 2278961 A,B HK 1006630 A IT 1265279 B JP 7506222 T MX 9307922 A NZ 259077 A WO 9414308 A SE 9402633 A SG 49350 A	23-05-1996 04-07-1994 19-08-1997 16-06-1994 03-08-1994 14-12-1994 05-03-1999 31-10-1996 06-07-1995 30-06-1994 26-11-1996 23-06-1994 03-10-1994 18-05-1998